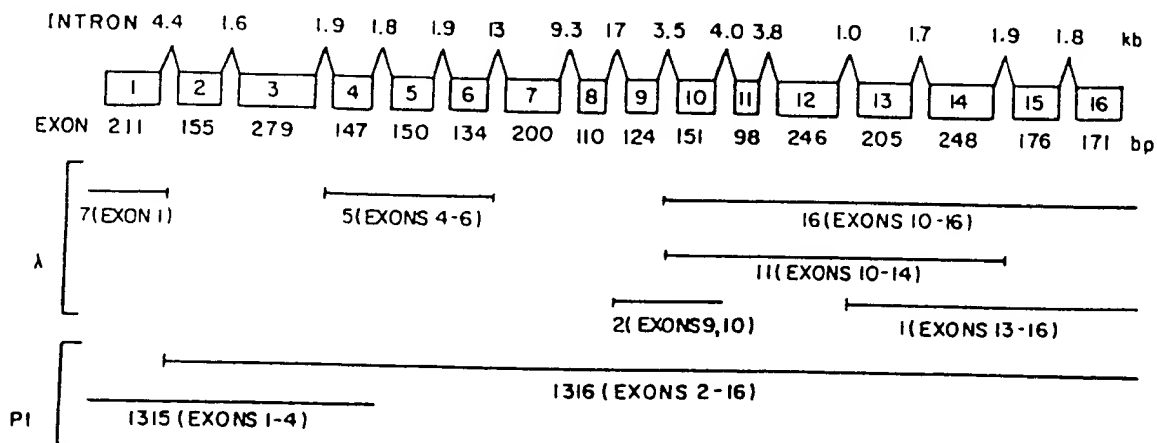




INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 15/00, 15/10, C12Q 1/68, C07K 14/47		A3	(11) International Publication Number: WO 95/14085
			(43) International Publication Date: 26 May 1995 (26.05.95)
(21) International Application Number: PCT/US94/13385		(74) Agents: EISENSTEIN, Ronald, I. et al.; Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, 130 Water Street, Boston, MA 02109 (US).	
(22) International Filing Date: 17 November 1994 (17.11.94)			
(30) Priority Data: 08/154,792 17 November 1993 (17.11.93) US 08/163,449 7 December 1993 (07.12.93) US 08/259,310 13 June 1994 (13.06.94) US		(81) Designated States: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO patent (KE, MW, SD, SZ).	
(71) Applicants (for all designated States except US): DANA- FARBER CANCER INSTITUTE [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US). UNIVERSITY OF VERMONT AND STATE AGRICULTURAL COLLEGE [US/US]; 349 Waterman Building, Burlington, VT 05405- 0160 (US).		Published With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.	
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): KOLODNER, Richard, D. [US/US]; 241 Perkins Street, Apartment 602, Jamaica Plain, MA 02130 (US). FISHEL, Richard [US/US]; 10A Barstow Road, Shelburne, VT 05482 (US). REENAN, Robert, A., G. [US/US]; 9 Westbrook Circle, Madison, WI 53711 (US).		(88) Date of publication of the international search report: 29 June 1995 (29.06.95)	

(54) Title: A METHOD FOR DETECTION OF ALTERATIONS IN THE DNA MISMATCH REPAIR PATHWAY



(57) Abstract

We have now discovered that eukaryotes, including mammals, have a DNA mismatch repair pathway analogous to the pathway that exists in bacteria. Defects or alterations in this mismatch repair pathway in a mammal, such as a human, will result in the accumulation of unstable repeated DNA sequences. Such a phenotype has a high correlation to disease state in a number of cancers, such as hereditary colon cancers. Accordingly, discovering a defect or alteration in the pathway can be diagnostic of a predisposition to cancer, and prognostic for a particular cancer. We have also discovered and sequenced one of the genes in this pathway in a number of mammals, including humans. This gene, referred to herein as MSH2, has many applications. It can be used in assays, to express gene product, for drug screens, and therapeutically. We also disclose herein a method for screening for other genes in this mismatch repair pathway.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Belgium	GR	Greece	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	HU	Hungary	NO	Norway
BG	Bulgaria	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IT	Italy	PL	Poland
BR	Brazil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Romania
CA	Canada	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo			SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	Republic of Korea	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazakhstan	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TG	Togo
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TJ	Tajikistan
DE	Germany	MC	Monaco	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	UA	Ukraine
ES	Spain	MG	Madagascar	US	United States of America
FI	Finland	ML	Mali	UZ	Uzbekistan
FR	France	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
GA	Gabon				

243

What is claimed is:

1. A method of determining whether there is an alteration in a eukaryotic DNA mismatch repair pathway which comprises:
 - a) isolating a biological specimen from a preselected eukaryote;
 - b) testing the specimen for an alteration in a DNA mismatch repair pathway nucleotide sequence or its expression product; and
 - c) comparing the results obtained in step b) with a wild type control.
2. The method of claim 1, wherein the biological specimen is selected from blood, tissue, serum, stool, urine, sputum, cerebrospinal fluid, supernatant from cell lysate and a eukaryotic cell sample.
3. The method of claim 1, wherein the eukaryote is a mammal.
4. The method of claim 3, wherein the mammal is a human.
5. The method of claim 1, wherein an alteration is indicative of a predisposition to malignant growth of cells in the mammal.
6. The method of claim 4, wherein the biological specimen is selected from a group of blood related individuals.
7. The method of claim 1, wherein the nucleotide sequence is a gene.
8. The method of claim 7, wherein the DNA mismatch repair pathway gene is *hMSH2*.

- 244 -

9. The method of claim 1, wherein the expression product is mRNA.

10. The method of claim 1, wherein the expression product is a protein.

5

11. The method of claim 1, wherein the alteration is in the nucleotide sequence of the DNA.

10

12. The method of claim 11, wherein the alteration is detected using a method of DNA amplification.

13. The method of claim 12, wherein the method of DNA amplification detects an alteration in at least one intron or exon.

15

14. The method of claim 13, wherein the alteration is detected in a *hMSH2* gene using a pair of oligonucleotide primers.

20

15. The method of claim 13, wherein said oligonucleotide primer of said pair comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs.:46-65 and 145-154.

16. The method of claim 1, wherein the alteration is detected by measuring the level of gene expression.

25

17. The method of claim 1, wherein the alteration is detected by identifying a mismatch between (1) a mismatch repair pathway gene or its mRNA in said tissue and (2) a nucleic acid probe complementary to a mammalian wild-type mismatch repair gene, when (1) and (2) hybridize to each other to form a duplex.

30

18. The method of claim 17, wherein the nucleic acid probe is a DNA probe.

5 19. The method of claim 16, wherein the mismatch is identified by enzymatic cleavage.

10 20. The method of claim 1, wherein the alteration in the DNA mismatch repair pathway is detected by amplification of mismatch repair pathway genes and hybridization of the amplified sequences to nucleic acid probes that are complementary to mutant mismatch repair pathway alleles.

21. A method of diagnosing a DNA mismatch repair defective tumor of a mammal, comprising:

5 isolating a tissue from said mammal suspected of being a tumor;
detecting an alteration in a DNA mismatch repair pathway gene or its expression product, wherein said alteration is indicative of a DNA mismatch repair defective tumor.

0 22. The method of claim 21, wherein the mammal is a human.

23. The method of claim 22, wherein the DNA mismatch repair defective tumor is colorectal ovary, endometrial (uterine), renal, bladder, skin, rectal and small bowel.

24. A method of prognosis in an individual having cancer, comprising, comparing a cancer cell from said individual with a non-cancer cell from said individual for the presence of an alteration in the DNA mismatch repair pathway.

- 246 -

25. The method of claim 24, wherein an alteration in both cells indicates a genetic basis for said cancer.

5 26. A method of screening for agents affecting the DNA mismatch repair pathway comprising:

a) selecting a first test cell having an alteration in the DNA mismatch repair pathway;

b) selecting a second test cell, said second cell derived from said first cell, but not having the alteration in the DNA mismatch repair pathway;

c) contacting said test cells with a selected agent; and

d) comparing the effects of said agent on the first and second test cells.

15 27. A human mismatch repair protein having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO.:16 or functional equivalents thereof.

20 28. An isolated nucleotide segment having the sequence as set forth in SEQ ID NO.:8.

29. An isolated nucleotide segment including a unique fragment of a nucleotide segment having the sequence set forth in SEQ ID NO:8.

25 30. An isolated nucleic acid segment having a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs.:35-50.

31. A method for isolating a DNA encoding a member of a eukaryotic DNA mismatch repair pathway comprising:

a) isolating a biological specimen from a preselected eukaryote;

- b) testing said specimen for in a DNA mismatch repair pathway gene; and
- c) isolating DNA comprising said DNA mismatch repair gene.

5

32. An isolated DNA segment which hybridizes under stringent conditions to a DNA fragment having the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:8 or a unique fragment thereof and codes for a member of a eukaryotic DNA mismatch repair pathway.

10

33. A vector containing the DNA of claim 31.

34. The vector of claim 32, wherein said vector is a retroviral vector.

35. A host transformed with the vector of claim 32 or 33.

15

36. A vector containing an antisense DNA segment of the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:8 or unique fragments thereof.

20

37. A kit for determining an alteration in a member of a DNA mismatch repair pathway by DNA amplification comprising:
a set of DNA oligonucleotide primers, said set allowing synthesis of a DNA encoding the DNA mismatch repair gene.

25

38. The kit of claim 36, wherein the DNA mismatch repair gene is hMSH2.

39. The kit of claim 36, wherein said primers are selected from the group of SEQ ID NOs.: 46-65 and 145-154.

- 248 -

40. A non-human mammal having an alteration in a member of the DNA mismatch repair pathway.

40. The non-human mammal of claim 40, wherein the member of the DNA mismatch repair pathway is MSH2.

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen	
Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2412
Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00814	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23. April 1997	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 24. April 1996
Bezeichnung der Erfindung Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreiber.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) J00S, Stefan Platanenweg 3 69221 Dossenheim		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) LICHTER, Peter Am Großen Wald 36 69251 Gaiberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER: ZUSTELLANSCHRIFTDie folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreterund ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Dr. Bernard Huber (Patentanwalt)

HUBER & SCHÜSSLER

Patentanwälte · Patent Attorneys

Truderinger Straße 246 · 81825 München

Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.**Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN**

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)

berücksichtigt.

iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATENDer Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten *(das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind)* ausgenommen*(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)*

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|--|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | | |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den | | |
| Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln aufführen) : | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | Scheck |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Dr. Andrea Schübler

Dr. Andrea Schübler

21. Nov. 1997

(Patentanwältin)

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):

3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum: Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung.

☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet

4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.

5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

"Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen"
Unser Zeichen: K 2412 - hu / wd

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen und einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

Im Bereich der molekularen Tumorgenetik ist es wichtig zu wissen, welche genetischen bzw. zytogenetischen Veränderungen in bestimmten Tumoren vorliegen, in welcher Abfolge sie entstehen und ob sie mit dem klinischen Verlauf, z.B. bei einer Therapie, korreliert sind. Um dies erfahren zu können, wäre es notwendig, die DNA kleiner Zellpopulationen bzw. von Einzelzellen der Tumoren untersuchen zu können. Viele Versuche wurden unternommen, dies zu erreichen. Bisherige Ergebnisse sind allerdings nicht befriedigend.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem genetische bzw. zytogenetische Veränderungen in der DNA kleiner Zellpopulationen bzw. von Einzelzellen nachgewiesen werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, das die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,
- (b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),
- (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels

eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und

- (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise.

Der Ausdruck "normale Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung, die keine bekannten numerischen Veränderungen in ihrer DNA aufweisen.

Aus solchen Zellen wird DNA isoliert und amplifiziert. Hierfür können übliche Verfahren verwendet werden. Für die Amplifikation bietet sich ein PCR-Verfahren an, bei dem tag-Primer verwendet werden. Der Ausdruck "tag" weist darauf hin, daß die Primer degenerative (universelle) Primer sein können, d.h. es handelt sich um Primer, die an vielen verschiedenen Stellen einer Zell-DNA binden können. Beispiele solcher Primer sind DOP- oder SiA-Primer.

Der Ausdruck "zu untersuchende Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung. Insbesondere sind es Tumorzellen oder Zellen aus dem Blut von schwangeren Personen. Besonders bevorzugt sind Zellen einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen. Ganz besonders bevorzugt sind Zellen mit einem Interphase-Kern.

Die zu untersuchenden Zellen werden einer in situ Hybridisierung mit der amplifizierten DNA aus den gesunden Zellen unterzogen. Hierfür können übliche Bedingungen und Materialien gewählt werden.

Die DNA aus den in situ hybridisierten Zellen wird als Template für eine Amplifikation verwendet. Hierfür bietet sich ein PCR-Verfahren an, bei dem die vorstehenden tag-Primer entsprechend verwendet werden.

Die amplifizierte DNA wird verwendet, um numerische Veränderungen festzustellen. Hierzu können übliche Verfahren durchgeführt werden. Günstig ist es, ein "comparative genomic hybridization"-Verfahren (CGH) durchzuführen (vgl.

Kallioniemi A, et al., Science 258:818, 1992, Kallioniemi O-P, et al., Genes Chromosom Cancer, 10:231, 1994 und Lichter P, et al. in Human Chromosomes, Hrsg. Verma R.S. und Babu A., New York, 1995, S. 191).

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, insbesondere von einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen, bereitgestellt. Ein solcher Kit umfaßt folgende Komponenten:

- (a) amplifizierte DNA aus gesunden Zellen, wobei die DNA von tag-Primern flankiert ist,
- (b) tag-Primer, und übliche
- (c) Hilfsmittel, insbesondere solche, die sich zur Identifizierung numerischer Veränderungen in einer DNA eignen.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, numerische Veränderungen in der DNA von Zellen, insbesondere kleiner Zellpopulationen und von Einzelzellen, nachzuweisen. Damit eignet sich die vorliegende Erfindung, in der Diagnostik von Erkrankungen eingesetzt zu werden, in denen es auf Untersuchungen kleinster Gewebeproben und Zellverbände ankommt. Solche Erkrankungen sind insbesondere Tumorerkrankungen. Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, embryonale Zellen im Blut von schwangeren Personen zu untersuchen. Sie stellt damit eine neue Möglichkeit in der pränatalen Diagnostik dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

- Figur 1 zeigt die schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens und
- Figur 2 zeigt chromosomale Überrepräsentationen in der Zelllinie Colo 320HSR mit und ohne Anwendung des erfindungsgemäßen Ver-

fahrens "Tagged Genome Hybridization" (TGH).

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

Beispiel: Analyse kleiner Zellpopulationen der Zelllinie Colo320 (HSR) mit dem erfindungsgemäßen Verfahren

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren (TGH-Verfahren, vgl. Fig. 1) an der Zelllinie Colo320 (HSR) durchgeführt. Das TGH-Verfahren verläuft in mehreren Einzelschritten:

- Präparation von Colo320 (HSR)-Interphasekernen auf Objektträger.
- Herstellung eines "tag"-markierten Sequenzpools normaler genomischer DNA mittels DOP-PCR.
- Modifizierung der "tag"-markierten genomischen DNA
- In situ Hybridisierung der "tag"-markierten genomischen DNA auf Interphasekerne der Zelllinie Colo320 (HSR).
- Isolierung von Colo320 (HSR)-Zellpopulationen definierter Anzahl mittels Mikromanipulation. Zur Verdeutlichung der Effizienz der TGH-Behandlung wurden sowohl mit "tag"-markierter DNA hybridisierte als auch nicht-hybridisierte Zellkerne isoliert und im weiteren verglichen.
- DNA-Amplifikation der isolierten Zellkerne mittels DOP-PCR.
- Verfahren der "comparative genomic hybridization" (CGH) zum Nachweis chromosomaler Imbalancen der Colo320 (HSR)-Zellen.

Bezüglich der Präparation der Interphasekerne, der Isolation genomischer DNA aus Blut und des CGH-Protokolls wird auf bekannte Verfahren verwiesen (vgl. Kallioniemi A, et al., Science 258:818, 1992, Kallioniemi O-P, et al., Genes Chromosom Cancer, 10:231, 1994 und Lichter P, et al. in Human Chromosomes, Hrsg. Verma R.S. und Babu A., New York, 1995, S. 191).

Schritt 1

Herstellung eines "tag"-markierten Sequenzpools normaler genomischer DNA mittels DOP-PCR.

Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- 10x Reaktionspuffer: 20 mM $MgCl_2$; 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8.4); 1 mg/ml Gelatine.
- 10x Nukleotid-Mix: 2 mM jedes Nukleotids (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (hergestellt aus dem Deoxynucleoside-Triphosphat-Set von Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1277049).
- 10x DOP-Primer: 20 μ M des Oligonukleotids 5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3', (N = A, C, G oder T).
- Für Minigele: Agarose; TBE Puffer: 0,089 M Tris-Borat, 0,089 M Borsäure, 2 mM EDTA (pH 8,0); geeigneter Größenmarker (z.B. 1kb-Marker; Kat.-Nr. 15615-016; Gibco BRL, Eggenstein); Gelladungspuffer mit 0.25% Bromphenolblau und 30% Glycerol.
- Zu markierende bzw. amplifizierende Ausgangs-DNA normaler Zellen.

Detaillierter Ablauf:

1. In ein 500 μ l Reaktionsgefäß (PCR-Gefäße mit integrierter Volumenbegrenzung; Sarstedt, Nümbrecht) wurden auf Eis folgende Komponenten pipettiert (Ges.-Vol. 50 μ l):
 - 100 ng genomische Ausgangs DNA
 - 5 μ l 10x Reaktionspuffer
 - 5 μ l 10x Nukleotid-Mix
 - 5 μ l 10x DOP-Primer
 - H₂O ad 50 μ l
 - 1.25 U Taq-Polymerase (sollte zuletzt zugesetzt werden).
2. Als Negativkontrolle wurden dieselben Komponenten pipettiert, jedoch ohne Zugabe der Ausgangs-DNA.
3. Für die PCR-Reaktionen kam ein Gerät der Omnigene/Hybaid (Typ AZ 1623; Lieferant MWG Biotech, Ebersbach b. München) zum Einsatz. Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet:
 - Initiale Denaturierung der Ausgangs DNA durch Erhitzen auf 93°C für 10 min.

- 5 Zyklen (sog. "low stringency Phase") mit jeweils:
94°C, 1 min; 30°C, 3 min; 30°C - 72°C, 3 min.; 72°C, 3 min.
 - 35 Zyklen (sog. "high stringency Phase") mit jeweils:
94°C, 1 min.; 62°C, 1 min.; 72°C, 3 min (mit einer Verlängerung von 1 sec / Zyklus);
 - Ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 10 min.
4. Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot von 7 µl des Produkts auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker diente ein 1-kb Marker. Die Auftrennung erfolgte in 1x TBE-Puffer für 30 min bei 100 Volt. Die aufgetragene DNA wurde durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und photographiert. Ein "Schmier" mit DNA-Fragmenten zwischen 200 Basenpaaren und 2000 Basenpaaren war i. d. R. sichtbar. In der Negativkontrolle war keine DNA in diesem Größenbereich nachweisbar.
5. Abschließend wurden die restlichen Nukleotide von der "tag"-markierten DNA m.H. eines "PCR-Purification Kits" (Diagen GmbH, Hilden, Kat.- Nr. 28106) abgetrennt.

Schritt 2

Modifizierung der "tag"-markierten genomischen DNA für die in situ Hybridisierung.

Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 10x Reaktionspuffer mit 0.5 M Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml bovinem Serumalbumin (Fraktion V, Kat.- Nr. 735078, Boehringer Mannheim)
- 0.1 M β-Mercaptoethanol.
- 10x Nukleotidstammlösung mit 0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP, 0,125 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr.1558706), 0,375 mM dTTP.
- Escherichia coli-DNA-Polymerase I (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, Kat.- Nr. 209L).
- DNase I-Stammlösung: 3 mg in 1 ml 0.15 M NaCl, 50% Glycerol.
- Säulenpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0.1% SDS.
- Säulen: Sephadex G50 (Medium), 1 ml Tuberkulinspritzen (z. B. "Primo" von Pharmaplast A/S, DK-4970 Rodby) , Glaswolle.
- Für Minigel: Agarose; TBE-Puffer; 1kb-Größenmarker (Gibco BRL, Eggenstein, Kat.-

Nr. 15615-016); Gelladungspuffer (s.o.)

Detaillierter Ablauf:

1. 2 µg der "tag"-markierten DNA (s. Schritt 1) wurden zusammen mit 10 µl des 10x Reaktionspuffers, 10 µl β-Mercaptoethanol, 10 µl der Nukleotidstammlösung, 20 U der DNA-Polymerase I und 2 µl einer 1:1000-Verdünnung der DNase-Stammlösung (in Wasser) in ein Reaktionsgefäß pipettiert.
2. Die Modifizierungsreaktion erfolgte bei 15°C für 30-40 min.
3. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis gestellt und ein Aliquot auf die für die in situ Hybridisierung geeignete Fragmentgröße getestet.
4. Die Fragmentlänge der DNA wurde durch Gelelektrophorese bestimmt. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden mit 3 µl Gelladungspuffer versetzt und im kochenden Wasserbad für 2-3 min denaturiert. Nach weiteren 3 min auf Eis wurde das Aliquot auf ein 1-2 % Agarose-Minigel zusammen mit dem 1 kb-Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 15 V/cm für 30 min. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid konnte das Gel unter UV-Licht photographiert und die Größe der DNA-Fragmente ermittelt werden.
5. Im optimalen Falle sollten die DNA-Fragmente in einem Größenbereich zwischen 500 und 1000 Basenpaaren liegen. Lag die durchschnittliche Größe der Fragmente oberhalb dieses Bereiches, wurde die verbliebene DNA nochmals mit DNase I inkubiert, bis die optimale Größe der Fragmente erreicht war.
6. Um die DNase zu inaktivieren, wurden dem Ansatz 2 µl 0.5 M EDTA (Endkonzentration 10 mM) und 1 µl 10% SDS (Endkonzentration 0.1%) zugesetzt und der Reaktionsansatz bei 68°C für 10 min erhitzt.
7. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden von der DNA-Probe durch Gelfiltration mittels Trennsäulen abgetrennt, die folgendermaßen hergestellt worden waren.
 - (a) Eine 1 ml-Tuberkulinspritze wurde zunächst mit Glaswolle bis zur 0.2 ml-Markierung gepackt und dann mit gepuffertem Sephadex G50 bis zur 1 ml-Marke aufgefüllt. Die Säule wurde in ein 15 ml-Gefäß überführt und bei 2000g 6 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert.
 - (b) Nach Zugabe von je 100 µl des Säulenpuffers wurden die Säulen erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.
 - (c) Die DNA wurde auf die Säule gegeben, zentrifugiert (2000g 6 min.) und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Endkonzentration dieser DNA-Probe beträgt etwa 20 ng/µl. Sie kann über längere Zeit (Monate bis Jahre) bei -20°C aufbewahrt werden.

Schritt 3

In situ Hybridisierung der "tag"-markierten genomischen DNA auf Interphasekerne der Linie Colo320 (HSR).

- A) Denaturierung der genomischen DNA der Colo320 (HSR) Interphasekerne.

Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Denaturierungslösung: 70% deionisiertes Formamid (für die Molekularbiologie, Kat.-Nr 112027, Merck, Darmstadt), 2x SSC, 50 mM Natriumphosphat (pH 7 mit 1 M HCl).
- Ethanol (eiskalt): 70%, 90% und 100%.

Detaillierter Ablauf:

1. Die Denaturierungslösung wurde in eine Küvette gegeben und in einem Wasserbad auf 70°C erhitzt.
2. Das Deckgläser (76 x 26 mm) mit den zu untersuchenden Colo 320(HSR)-Zellkernen wurde genau 2 min in dieser Lösung inkubiert und dann sofort in den kalten 70% Alkohol überführt.
3. Die Deckgläser wurden jeweils 5 min. in 70%, 90% und 100% Ethanol entwässert und dann luftgetrocknet.

- B) Präzipitierung und Denaturierung der "tag"-markierten DNA-Probe für die in situ Hybridisierung.

Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 3 M Natriumacetat, pH 5.2.
- Deionisiertes Formamid (für die Molekularbiologie, Kat.-Nr 112027, Merck, Darmstadt). Die Deionisierung erfolgte durch Rühren des Formamids mit einem Ionenaustauscher (z. B. AG 501-X8 (D) Resin, Kat.-Nr. 142-6425 der Biorad, München).
- 2x Hybridisierungspuffer: 4x SSC, 20% Dextransulfat.

Detaillierter Ablauf:

1. 1 µg der "tag"-markierten DNA und 50 µg humaner Cot1-DNA (Gibco-BRL, Eggenstein, Kat. Nr. 5279SA) wurden durch Zugabe von 1/20 Volumen 3 M Natriumacetat und 2.5 Volumen 100% Ethanol präzipitiert.

2. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm für 10 min und 4°C wurde der Überstand abgetrennt, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, wieder zentrifugiert (12000 rpm, 10 min, 4°C) und dann lyophilisiert.
3. Die präzipitierte DNA wurde in 6 µl deionisiertem Formamid aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Vortex).
4. Nach Zugabe von 6 µl 2x Hybridisierungspuffer wurde wiederum 30 min geschüttelt.
5. Die DNA wurde bei 75°C für 5 min. denaturiert, 5 min. auf Eis gestellt und dann 20 - 30 min bei 37°C inkubiert ("preannealing").

C) In situ Hybridisierung

Detaillierter Ablauf:

1. 12 µl des Hybridisierungsmixes mit der denaturierten DNA wurden auf ein großes Deckglas mit den zu untersuchenden Zellkernen gegeben.
2. Ein 18 x 18 mm Deckglas wurde aufgelegt.
3. Das 18 x 18 mm Deckglas wurde mit Flüssigklebstoff abgedichtet und das Präparat in einer feuchten Kammer für 48 h bei 37°C inkubiert.

D) Waschen und Detektion der hybridisierten Zellkerne

Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Waschlösung A: 50% Formamid (p. A. Kat.- Nr. 9684, Merck, Darmstadt), 2xSSC.
- Waschlösung B: 0.1x SSC.
- Waschlösung C: 4x SSC, 0.1% Tween 20.
- Waschlösung D: 2x SSC, 0.05% Tween 20.
- "Blocking"-Lösung : 3% BSA, 4x SSC, 0.1% Tween 20.
- Detektionspuffer: 1% BSA, 4x SSC, 0.1% Tween 20.
- Anti-Digoxigenin-Rhodamin, FAB-Fragmente (Kat.- Nr. 1207750, Boehringer Mannheim)
- "Antifade"-Lösung: 0.233 g DABCO (1,4-Diazabicyclo-2.2.2-octane), 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 90% Glycerol.
- 4,6-diamino-2-Phenylindol (DAPI)

Detaillierter Ablauf:

1. Die Waschlösungen A und B wurden in einer Küvette auf 42°C im Wasserbad erwärmt.
2. Der Dichtring aus Flüssigklebstoff wurde vom Deckglas entfernt und dieses dann für 3 x 10 min. in Waschlös. A bei 42°C gewaschen.
3. Anschließend wurde in Waschlösung B 3 x 10 min gewaschen.
4. 200 µl der "Blocking"-Lösung wurden auf das Deckglas pipettiert, wieder ein Deckglas darüber gegeben und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.
5. Die "Blocking"-Lösung wurde entfernt; stattdessen wurden 200 µl des Detektionspuffers mit 6 µg/ml Rhodamin-konjugiertem Anti-Digoxigenin (Boehringer, Mannheim) auf das Deckglas gegeben und unter einem Deckglas 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.
6. Das große Deckglas mit den Zellkernen wurde dann in Waschlösung C dreimal je 10 min bei 42°C gewaschen.
7. Anschließend wurde das große Deckglas mit den Zellkernen 20 min in 2x SSC, in welchem 200 ng/ml (DAPI) gelöst waren, inkubiert.
8. Waschen des Deckglases in Waschlösung D für 1-2 min bei Raumtemperatur.
9. Eindecken der hybridisierten Interphasekerne in "Antifade"-Lösung.

Schritt 4

Isolierung der hybridisierten Kerne durch Mikromanipulation

Geräte:

Mikroskop Axioskop FS (Carl Zeiss, Jena) ausgerüstet für die Fluoreszenzmikroskopie.

De Fonbrune Mikromanipulator (Bachofer, Reutlingen).

De Fonbrune Mikroschmiede (Bachofer, Reutlingen) zur Herstellung von Mikrospitzen.

Glasplatten aus B270: Größe 70 x 35 mm, Stärke 6 mm; mit Absatz: Breite 26 mm; Tiefe 4 mm. (Hergestellt durch Berliner Glas KG, Waldkraichburger Straße 5, 12347 Berlin, Best. Nr B 100158 - PO / e h).

Detaillierter Ablauf:

1. Das große Deckglas mit den zu isolierenden Colo-Zellkernen wurde (mit den Zellen nach unten zeigend) auf die B270 Glasplatte gegeben; der Zwischenraum zwischen Sockelboden und Deckglas (bzw. Zellkernen) wurde mit "Antifade"-Lösung gefüllt.
2. Eine in der Mikroschmiede hergestellte Mikrospitze wurde in den Mikromanipulator eingesetzt. Die Mikrospitze wurde m. H. der Mikroschmiede so ausgezogen, daß sie in einem Winkel von etwa 30° nach oben zeigte.

3. Die Mikrospritze wurde nun in den mit der Antifade-Lösung gefüllten Zwischenraum geschoben, so daß sie von unten an die zu isolierenden Zellkerne reichte.
4. Die Colokerne konnten unter Fluoreszenzbedingungen durch einen geeigneten Filter (Filtersatz Nr. 487915-9901 für Rhodamin oder Filtersatz Nr. 487901-9901 für DAPI, Carl Zeiss, Jena) im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Durch Verwendung des Durchlichts war es außerdem möglich, gleichzeitig die Mikrospritze zu erkennen. Auf diese Weise können die Zellkerne einzeln auf die Mikrospritzen "aufzuspießt" werden. (Anmerkung: Da die Zellkerne in der "Antifade"-Lösung nicht brüchig, sondern elastisch sind, können sie als Ganzes isoliert werden).
5. Nachdem jeweils ein Kern mit einer Nadel aufgenommen war, wurde diese am Boden eines mit 20 µl H₂O gefüllten PCR-Röhrchens abgebrochen. Auf diese Weise konnten Populationen mit genau definierter Zellzahl an hybridisierten und nicht-hybridisierten Kernen isoliert werden. (Anmerkung: Die nicht-hybridisierten Zellkerne waren gleich behandelt worden wie die hybridisierten Kerne, jedoch war bei der in situ Hybridisierung keine "tag"-markierte DNA zugegeben worden).

Im Anschluß an diesen Schritt erfolgte die DOP-PCR der isolierten Kerne. Dieses Protokoll ist identisch mit Schritt 1 (Punkte 1-5), jedoch wird außer den isolierten Kernen keine weitere Ausgangs-DNA zugegeben. Das DOP-PCR-Produkt wurde für eine übliche CGH-Analyse verwendet (vgl. Kallioniemi A, et al., Science 258:818, 1992, Kallioniemi O-P, et al., Genes Chromosom Cancer, 10:231, 1994 und Lichter P, et al. in Human Chromosomes, Hrsg. Verma R.S. und Babu A., New York, 1995, S. 191). Es zeigte sich, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in 30 bzw. 10 Colo320 (HSR) Zellen zwischen 89% und 94% aller Chromosomen-Überrepräsentationen erkannt wurden, während es ohne das TGH-Verfahren nur zwischen 38% und 44% waren. Ferner liegt der Anteil der falsch-positiven Befunde in der TGH-behandelten Gruppe deutlich niedriger als in der nicht-TGH-behandelten (7 gegenüber 19) (vgl. Fig. 2).

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte:

5 (a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,

(b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),

10 (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und

15 (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen von Tumoren stammen.

20 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen aus dem Blut von schwangeren Personen stammen.

25 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen solche einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen einen Interphase-Kern aufweisen.

5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die tag-Primer degenerative Primer sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung von (d) ein CGH-Verfahren umfaßt.

10 8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 7, umfassend die folgenden Komponenten:

(a) amplifizierte DNA aus normalen Zellen, wobei die DNA von tag-Primern flankiert ist,

15

(b) tag-Primer, und übliche

(c) Hilfsmittel, insbesondere solche, die sich zur Identifizierung numerischer Veränderungen in einer DNA eignen.

20

Zusammenfassung

Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte:

5

(a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,

10

(b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),

(c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und

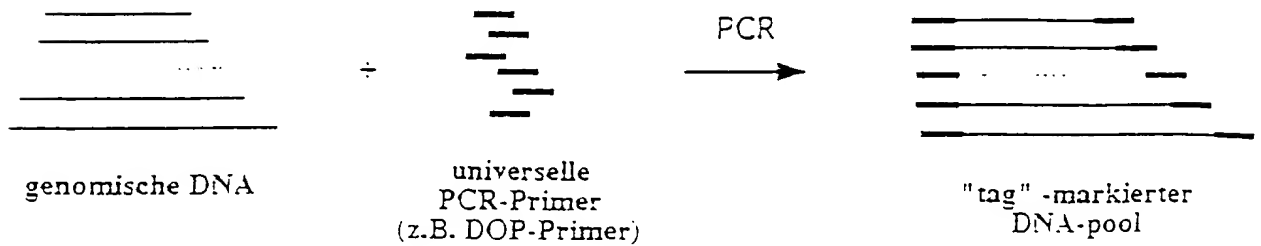
15

(d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise.

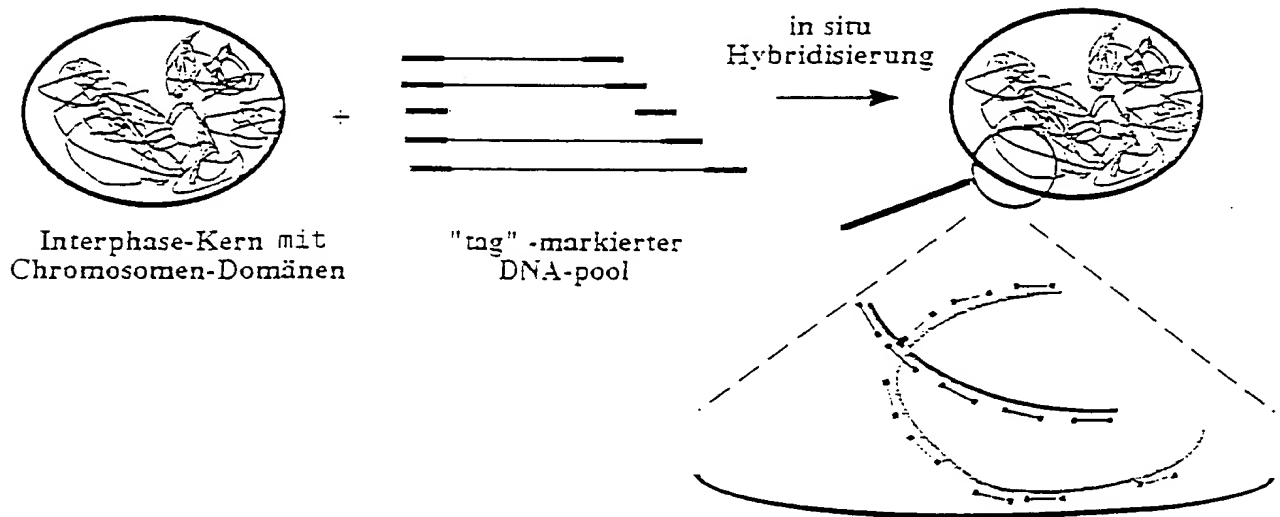
Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

Schematische Darstellung der "Tagged Genome Hybridization"

- 1.) Herstellung eines repräsentativen "tag"-markierten DNA-Pools aus genomischer DNA normaler Zellen mittels eines universellen PCR-Verfahrens.



- 2.) In situ Hybridisierung von Interphasekernen mit "tag"-markiertem DNA-pool.



- 3.) Universelle PCR der isolierten Interphase-Kerne mit identischem Primer (siehe Schritt 1)

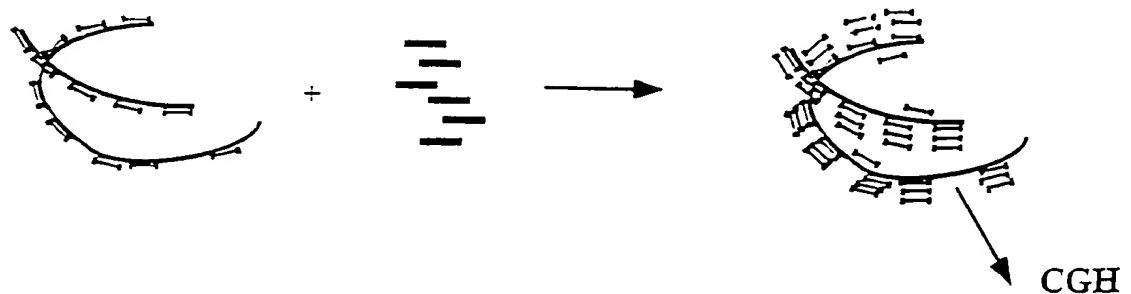
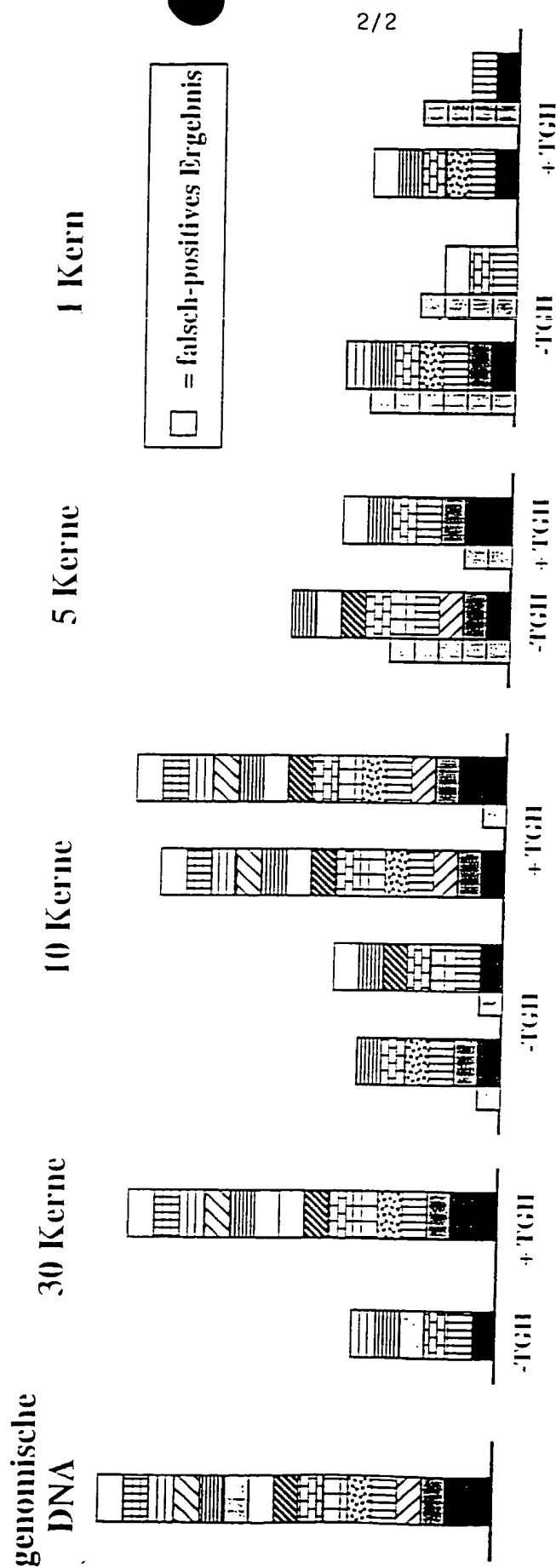


Fig. 1

Nachweisempfindlichkeit chromosomaler Überrepräsentationen in Colo 320 (HSR) - Zellen nach universeller PCR (DOP-PCR) und CGH



Überrepräsentationen chromosomaler Regionen der Zelllinie Colo 320 (HSR), nachgewiesen mittels CGH

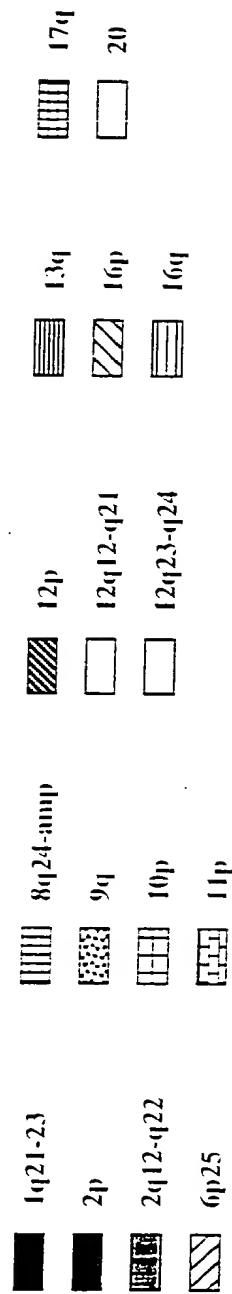


Fig. 2

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40185 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. Oktober 1997 (30.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00814 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. April 1997 (23.04.97) (30) Prioritätsdaten: 196 16 381.1 24. April 1996 (24.04.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOOS, Stefan [DE/DE]; Platanenweg 3, D-69221 Dossenheim (DE). LICHTER, Peter [DE/DE]; Am Großen Wald 36, D-69251 Gaiberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schlüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: IDENTIFICATION OF NUMERICAL CHANGES IN CELL DNA (54) Bezeichnung: NACHWEIS NUMERISCHER VERÄNDERUNGEN IN DER DNA VON ZELLEN (57) Abstract <p>The invention pertains to a process for identifying numerical changes in cell DNA, comprising the following steps: (a) isolate DNA from normal cells and amplify the DNA by means of a polymerase chain reaction using tag primers; (b) in situ hybridize the cells under study with the amplified DNA; (c) amplify DNA from the in situ hybridized cells from (b) by means of a polymerase chain reaction using the tag primers from (a), and (d) identify numerical changes in the amplified DNA from (c) in a normal way. The invention also pertains to a kit suitable for carrying out the process.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte: (a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern, (b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a), (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise. Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BG	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BJ	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BR	Brasilien	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BY	Belarus	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
CA	Kanada	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

"Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen"

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen und einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

Im Bereich der molekularen Tumorgenetik ist es wichtig zu wissen, welche genetischen bzw. zytogenetischen Veränderungen in bestimmten Tumoren vorliegen, in welcher Abfolge sie entstehen und ob sie mit dem klinischen Verlauf, z.B. bei einer Therapie, korreliert sind. Um dies erfahren zu können, wäre es notwendig, die DNA kleiner Zellpopulationen bzw. von Einzelzellen der Tumoren untersuchen zu können. Viele Versuche wurden unternommen, dies zu erreichen. Bisherige Ergebnisse sind allerdings nicht befriedigend.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem genetische bzw. zytogenetische Veränderungen in der DNA kleiner Zellpopulationen bzw. von Einzelzellen nachgewiesen werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, das die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,
- (b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),
- (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels

eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und

- (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise.

Der Ausdruck "normale Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung, die keine bekannten numerischen Veränderungen in ihrer DNA aufweisen.

Aus solchen Zellen wird DNA isoliert und amplifiziert. Hierfür können übliche Verfahren verwendet werden. Für die Amplifikation bietet sich ein PCR-Verfahren an, bei dem tag-Primer verwendet werden. Der Ausdruck "tag" weist darauf hin, daß die Primer degenerative (universelle) Primer sein können, d.h. es handelt sich um Primer, die an vielen verschiedenen Stellen einer Zell-DNA binden können. Beispiele solcher Primer sind DOP- oder SiA-Primer.

Der Ausdruck "zu untersuchende Zellen" umfaßt Zellen jeglicher Art und Abstammung. Insbesondere sind es Tumorzellen oder Zellen aus dem Blut von schwangeren Personen. Besonders bevorzugt sind Zellen einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen. Ganz besonders bevorzugt sind Zellen mit einem Interphase-Kern.

Die zu untersuchenden Zellen werden einer in situ Hybridisierung mit der amplifizierten DNA aus den gesunden Zellen unterzogen. Hierfür können übliche Bedingungen und Materialien gewählt werden.

Die DNA aus den in situ hybridisierten Zellen wird als Template für eine Amplifikation verwendet. Hierfür bietet sich ein PCR-Verfahren an, bei dem die vorstehenden tag-Primer entsprechend verwendet werden.

Die amplifizierte DNA wird verwendet, um numerische Veränderungen festzustellen. Hierzu können übliche Verfahren durchgeführt werden. Günstig ist es, ein "comparative genomic hybridization"-Verfahren (CGH) durchzuführen (vgl.

Kallioniemi A, et al., Science 258:818, 1992, Kallioniemi O-P, et al., Genes Chromosom Cancer, 10:231, 1994 und Lichter P, et al. in Human Chromosomes, Hrsg. Verma R.S. und Babu A., New York, 1995, S. 191).

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit zur Durchführung des Verfahrens zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, insbesondere von einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen, bereitgestellt. Ein solcher Kit umfaßt folgende Komponenten:

- (a) amplifizierte DNA aus gesunden Zellen, wobei die DNA von tag-Primern flankiert ist,
- (b) tag-Primer, und übliche
- (c) Hilfsmittel, insbesondere solche, die sich zur Identifizierung numerischer Veränderungen in einer DNA eignen.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, numerische Veränderungen in der DNA von Zellen, insbesondere kleiner Zellpopulationen und von Einzelzellen, nachzuweisen. Damit eignet sich die vorliegende Erfindung, in der Diagnostik von Erkrankungen eingesetzt zu werden, in denen es auf Untersuchungen kleinster Gewebeproben und Zellverbände ankommt. Solche Erkrankungen sind insbesondere Tumorerkrankungen. Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, embryonale Zellen im Blut von schwangeren Personen zu untersuchen. Sie stellt damit eine neue Möglichkeit in der pränatalen Diagnostik dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

- Figur 1 zeigt die schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens und
- Figur 2 zeigt chromosomale Überrepräsentationen in der Zelllinie Colo 320HSR mit und ohne Anwendung des erfindungsgemäßen Ver-

fahrens "Tagged Genome Hybridization" (TGH).

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

Beispiel: Analyse kleiner Zellpopulationen der Zelllinie Colo320 (HSR) mit dem erfindungsgemäßen Verfahren

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren (TGH-Verfahren, vgl. Fig. 1) an der Zelllinie Colo320 (HSR) durchgeführt. Das TGH-Verfahren verläuft in mehreren Einzelschritten:

- Präparation von Colo320 (HSR)-Interphasekernen auf Objektträger.
- Herstellung eines "tag"-markierten Sequenzpools normaler genomischer DNA mittels DOP-PCR.
- Modifizierung der "tag"-markierten genomischen DNA
- In situ Hybridisierung der "tag"-markierten genomischen DNA auf Interphasekerne der Zelllinie Colo320 (HSR).
- Isolierung von Colo320 (HSR)-Zellpopulationen definierter Anzahl mittels Mikromanipulation. Zur Verdeutlichung der Effizienz der TGH-Behandlung wurden sowohl mit "tag"-markierter DNA hybridisierte als auch nicht-hybridisierte Zellkerne isoliert und im weiteren verglichen.
- DNA-Amplifikation der isolierten Zellkerne mittels DOP-PCR.
- Verfahren der "comparative genomic hybridization" (CGH) zum Nachweis chromosomaler Imbalancen der Colo320 (HSR)-Zellen.

Bezüglich der Präparation der Interphasekerne, der Isolation genomischer DNA aus Blut und des CGH-Protokolls wird auf bekannte Verfahren verwiesen (vgl. Kallioniemi A, et al., Science 258:818, 1992, Kallioniemi O-P, et al., Genes Chromosom Cancer, 10:231, 1994 und Lichter P, et al. in Human Chromosomes, Hrsg. Verma R.S. und Babu A., New York, 1995, S. 191).

Schritt 1

Herstellung eines "tag"-markierten Sequenzpools normaler genomischer DNA mittels DOP-PCR.

Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- 10x Reaktionspuffer: 20 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8.4); 1 mg/ml Gelatine.
- 10x Nukleotid-Mix: 2 mM jedes Nukleotids (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (hergestellt aus dem Deoxynucleoside-Triphosphat-Set von Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1277049).
- 10x DOP-Primer: 20 µM des Oligonukleotids 5'CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3', (N = A, C, G oder T).
- Für Minigele: Agarose; TBE Puffer: 0,089 M Tris-Borat, 0,089 M Borsäure, 2 mM EDTA (pH 8,0); geeigneter Größenmarker (z.B. 1kb-Marker; Kat.-Nr. 15615-016; Gibco BRL, Eggenstein); Gelladungspuffer mit 0.25% Bromphenolblau und 30% Glycerol.
- Zu markierende bzw. amplifizierende Ausgangs-DNA normaler Zellen.

Detaillierter Ablauf:

1. In ein 500 µl Reaktionsgefäß (PCR-Gefäße mit integrierter Volumenbegrenzung; Sarstedt, Nümbrecht) wurden auf Eis folgende Komponenten pipettiert (Ges.-Vol. 50 µl):
 - 100 ng genomische Ausgangs DNA
 - 5 µl 10x Reaktionspuffer
 - 5 µl 10x Nukleotid-Mix
 - 5 µl 10x DOP-Primer
 - H₂O ad 50 µl
 - 1.25 U Taq-Polymerase (sollte zuletzt zugesetzt werden).
2. Als Negativkontrolle wurden dieselben Komponenten pipettiert, jedoch ohne Zugabe der Ausgangs-DNA.
3. Für die PCR-Reaktionen kam ein Gerät der Omnigene/Hybaid (Typ AZ 1623; Lieferant MWG Biotech, Ebersbach b. München) zum Einsatz. Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet:
 - Initiale Denaturierung der Ausgangs DNA durch Erhitzen auf 93°C für 10 min.

- 7 -

- 5 Zyklen (sog. "low stringency Phase") mit jeweils:
94°C, 1 min; 30°C, 3 min; 30°C -72°C, 3 min.; 72°C, 3 min.
 - 35 Zyklen (sog. "high stringency Phase") mit jeweils:
94°C, 1 min.; 62°C, 1 min.; 72°C, 3 min (mit einer Verlängerung von 1 sec / Zyklus);
 - Ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 10 min.
4. Nach der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot von 7 µl des Produkts auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker diente ein 1-kb Marker. Die Auftrennung erfolgte in 1x TBE-Puffer für 30 min bei 100 Volt. Die aufgetragene DNA wurde durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und photographiert. Ein "Schmier" mit DNA-Fragmenten zwischen 200 Basenpaaren und 2000 Basenpaaren war i. d. R. sichtbar. In der Negativkontrolle war keine DNA in diesem Größenbereich nachweisbar.
5. Abschließend wurden die restlichen Nukleotide von der "tag"-markierten DNA m.H. eines "PCR-Purification Kits". (Diagen GmbH, Hilden, Kat.- Nr. 28106) abgetrennt.

Schritt 2

Modifizierung der "tag"-markierten genomischen DNA für die in situ Hybridisierung.

Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 10x Reaktionspuffer mit 0.5 M Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml bovinem Serumalbumin (Fraktion V, Kat.- Nr. 735078, Boehringer Mannheim)
- 0.1 M β-Mercaptoethanol.
- 10x Nukleotidstammlösung mit 0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP, 0,125 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr.1558706), 0,375 mM dTTP.
- Escherichia coli-DNA-Polymerase I (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, Kat.- Nr. 209L).
- DNase I-Stammlösung: 3 mg in 1 ml 0.15 M NaCl, 50% Glycerol.
- Säulenpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0.1% SDS.
- Säulen: Sephadex G50 (Medium), 1 ml Tuberkulinspritzen (z. B. "Primo" von Pharmaplast A/S, DK-4970 Rodby), Glaswolle.
- Für Minigel: Agarose; TBE-Puffer; 1kb-Größenmarker (Gibco BRL, Eggenstein, Kat.-

Nr. 15615-016); Gelladungspuffer (s.o.)

Detaillierter Ablauf:

1. 2 µg der "tag"-markierten DNA (s. Schritt 1) wurden zusammen mit 10 µl des 10x Reaktionspuffers, 10 µl β-Mercaptoethanol, 10 µl der Nukleotidstammlösung, 20 U der DNA-Polymerase I und 2 µl einer 1:1000-Verdünnung der DNase-Stammlösung (in Wasser) in ein Reaktionsgefäß pipettiert.
2. Die Modifizierungsreaktion erfolgte bei 15°C für 30-40 min.
3. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis gestellt und ein Aliquot auf die für die in situ Hybridisierung geeignete Fragmentgröße getestet.
4. Die Fragmentlänge der DNA wurde durch Gelelektrophorese bestimmt. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden mit 3 µl Gelladungspuffer versetzt und im kochenden Wasserbad für 2-3 min denaturiert. Nach weiteren 3 min auf Eis wurde das Aliquot auf ein 1-2 % Agarose-Minigel zusammen mit dem 1 kb-Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 15 V/cm für 30 min. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid konnte das Gel unter UV-Licht photographiert und die Größe der DNA-Fragmente ermittelt werden.
5. Im optimalen Falle sollten die DNA-Fragmente in einem Größenbereich zwischen 500 und 1000 Basenpaaren liegen. Lag die durchschnittliche Größe der Fragmente oberhalb dieses Bereiches, wurde die verbliebene DNA nochmals mit DNase I inkubiert, bis die optimale Größe der Fragmente erreicht war.
6. Um die DNase zu inaktivieren, wurden dem Ansatz 2 µl 0.5 M EDTA (Endkonzentration 10 mM) und 1 µl 10% SDS (Endkonzentration 0.1%) zugesetzt und der Reaktionsansatz bei 68°C für 10 min erhitzt.
7. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden von der DNA-Probe durch Gelfiltration mittels Trennsäulen abgetrennt, die folgendermaßen hergestellt worden waren.
 - (a) Eine 1 ml-Tuberkulinspritze wurde zunächst mit Glaswolle bis zur 0.2 ml-Markierung gepackt und dann mit gepuffertem Sephadex G50 bis zur 1 ml-Marke aufgefüllt. Die Säule wurde in ein 15 ml-Gefäß überführt und bei 2000g 6 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert.
 - (b) Nach Zugabe von je 100 µl des Säulenpuffers wurden die Säulen erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.
 - (c) Die DNA wurde auf die Säule gegeben, zentrifugiert (2000g 6 min.) und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Endkonzentration dieser DNA-Probe beträgt etwa 20 ng/µl. Sie kann über längere Zeit (Monate bis Jahre) bei -20°C aufbewahrt werden.

Schritt 3

In situ Hybridisierung der "tag"-markierten genomischen DNA auf Interphasekerne der Linie Colo320 (HSR).

A) Denaturierung der genomischen DNA der Colo320 (HSR) Interphasekerne.

Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Denaturierungslösung: 70% deionisiertes Formamid (für die Molekularbiologie, Kat.-Nr 112027, Merck, Darmstadt), 2x SSC, 50 mM Natriumphosphat (pH 7 mit 1 M HCl).
- Ethanol (eiskalt): 70%, 90% und 100%.

Detaillierter Ablauf:

1. Die Denaturierungslösung wurde in eine Küvette gegeben und in einem Wasserbad auf 70°C erhitzt.
2. Das Deckgläser (76 x 26 mm) mit den zu untersuchenden Colo 320(HSR)-Zellkernen wurde genau 2 min in dieser Lösung inkubiert und dann sofort in den kalten 70% Alkohol überführt.
3. Die Deckgläser wurden jeweils 5 min. in 70%, 90% und 100% Ethanol entwässert und dann luftgetrocknet.

B) Präzipitierung und Denaturierung der "tag"-markierten DNA-Probe für die in situ Hybridisierung.

Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 3 M Natriumacetat, pH 5.2.
- Deionisiertes Formamid (für die Molekularbiologie, Kat.-Nr 112027, Merck, Darmstadt). Die Deionisierung erfolgte durch Rühren des Formamids mit einem Ionenaustauscher (z. B. AG 501-X3 (D) Resin, Kat.-Nr. 142-6425 der Biorad, München).
- 2x Hybridisierungspuffer: 4x SSC, 20% Dextransulfat.

Detaillierter Ablauf:

1. 1 µg der "tag"-markierten DNA und 50 µg humaner Cot1-DNA (Gibco-BRL, Eggenstein, Kat. Nr. 5279SA) wurden durch Zugabe von 1/20 Volumen 3 M Natriumacetat und 2.5 Volumen 100% Ethanol präzipitiert.

2. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm für 10 min und 4°C wurde der Überstand abgetrennt, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, wieder zentrifugiert (12000 rpm, 10 min, 4°C) und dann lyophilisiert.
3. Die präzipitierte DNA wurde in 6 µl deionisiertem Formamid aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Vortex).
4. Nach Zugabe von 6 µl 2x Hybridisierungspuffer wurde wiederum 30 min geschüttelt.
5. Die DNA wurde bei 75°C für 5 min. denaturiert, 5 min. auf Eis gestellt und dann 20 - 30 min bei 37°C inkubiert ("preannealing").

C) In situ Hybridisierung

Detaillierter Ablauf:

1. 12 µl des Hybridisierungsmixes mit der denaturierten DNA wurden auf ein großes Deckglas mit den zu untersuchenden Zellkernen gegeben.
2. Ein 18 x 18 mm Deckglas wurde aufgelegt.
3. Das 18 x 18 mm Deckglas wurde mit Flüssigklebstoff abgedichtet und das Präparat in einer feuchten Kammer für 48 h bei 37°C inkubiert.

D) Waschen und Detektion der hybridisierten Zellkerne

Reagenzien, Puffer und Lösungen:

- Waschlösung A: 50% Formamid (p. A. Kat.- Nr. 9684, Merck, Darmstadt), 2xSSC.
- Waschlösung B: 0.1x SSC.
- Waschlösung C: 4x SSC, 0.1% Tween 20.
- Waschlösung D: 2x SSC, 0.05% Tween 20.
- "Blocking"-Lösung : 3% BSA, 4x SSC, 0.1% Tween 20.
- Detektionspuffer: 1% BSA, 4x SSC, 0.1% Tween 20.
- Anti-Digoxigenin-Rhodamin, FAB-Fragmente (Kat.- Nr. 1207750, Boehringer Mannheim)
- "Antifade"-Lösung: 0.233 g DABCO (1,4-Diazabicyclo-2.2.2-octane), 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 90% Glycerol.
- 4,6-diamino-2-Phenylindol (DAPI)

Detaillierter Ablauf:

1. Die Waschlösungen A und B wurden in einer Küvette auf 42°C im Wasserbad erwärmt.
2. Der Dichtring aus Flüssigklebstoff wurde vom Deckglas entfernt und dieses dann für 3 x 10 min. in Waschlös. A bei 42°C gewaschen.
3. Anschließend wurde in Waschlösung B 3 x 10 min gewaschen.
4. 200 µl der "Blocking" -Lösung wurden auf das Deckglas pipettiert, wieder ein Deckglas darüber gegeben und 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.
5. Die "Blocking"-Lösung wurde entfernt; stattdessen wurden 200 µl des Detektionspuffers mit 6 µg/ml Rhodamin-konjugiertem Anti-Digoxigenin (Boehringer, Mannheim) auf das Deckglas gegeben und unter einem Deckglas 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.
6. Das große Deckglas mit den Zellkernen wurde dann in Waschlösung C dreimal je 10 min bei 42°C gewaschen.
7. Anschließend wurde das große Deckglas mit den Zellkernen 20 min in 2x SSC, in welchem 200 ng/ml (DAPI) gelöst waren, inkubiert.
8. Waschen des Deckglases in Waschlösung D für 1-2 min bei Raumtemperatur.
9. Eindecken der hybridisierten Interphasekerne in "Antifade"-Lösung.

Schritt 4

Isolierung der hybridisierten Kerne durch Mikromanipulation

Geräte:

Mikroskop Axioskop FS (Carl Zeiss, Jena) ausgerüstet für die Fluoreszenzmikroskopie.

De Fonbrune Mikromanipulator (Bachofer, Reutlingen).

De Fonbrune Mikroschmiede (Bachofer, Reutlingen) zur Herstellung von Mikrospitzen.

Glasplatten aus B270: Größe 70 x 35 mm, Stärke 6 mm; mit Absatz: Breite 26 mm; Tiefe 4 mm. (Hergestellt durch Berliner Glas KG, Waldkraichburger Straße 5, 12347 Berlin, Best. Nr B 100158 - PO / e h).

Detaillierter Ablauf:

1. Das große Deckglas mit den zu isolierenden Colo-Zellkernen wurde (mit den Zellen nach unten zeigend) auf die B270 Glasplatte gegeben; der Zwischenraum zwischen Sockelboden und Deckglas (bzw. Zellkernen) wurde mit "Antifade"-Lösung gefüllt.
2. Eine in der Mikroschmiede hergestellte Mikrospitze wurde in den Mikromanipulator eingesetzt. Die Mikrospitze wurde m. H. der Mikroschmiede so ausgezogen, daß sie in einem Winkel von etwa 30° nach oben zeigte.

3. Die Mikrospritze wurde nun in den mit der Antifade-Lösung gefüllten Zwischenraum geschoben, so daß sie von unten an die zu isolierenden Zellkerne reichte.
4. Die Colokerne konnten unter Fluoreszenzbedingungen durch einen geeigneten Filter (Filtersatz Nr. 487915-9901 für Rhodamin oder Filtersatz Nr. 487901-9901 für DAPI, Carl Zeiss, Jena) im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Durch Verwendung des Durchlichts war es außerdem möglich, gleichzeitig die Mikrospritze zu erkennen. Auf diese Weise können die Zellkerne einzeln auf die Mikrospritzen "aufzuspießt" werden. (Anmerkung: Da die Zellkerne in der "Antifade"-Lösung nicht brüchig, sondern elastisch sind, können sie als Ganzes isoliert werden).
5. Nachdem jeweils ein Kern mit einer Nadel aufgenommen war, wurde diese am Boden eines mit 20 µl H₂O gefüllten PCR-Röhrchens abgebrochen. Auf diese Weise konnten Populationen mit genau definierter Zellzahl an hybridisierten und nicht-hybridisierten Kernen isoliert werden. (Anmerkung: Die nicht-hybridisierten Zellkerne waren gleich behandelt worden wie die hybridisierten Kerne, jedoch war bei der in situ Hybridisierung keine "tag"-markierte DNA zugegeben worden).

Im Anschluß an diesen Schritt erfolgte die DOP-PCR der isolierten Kerne. Dieses Protokoll ist identisch mit Schritt 1 (Punkte 1-5), jedoch wird außer den isolierten Kernen keine weitere Ausgangs-DNA zugegeben. Das DOP-PCR-Produkt wurde für eine übliche CGH-Analyse verwendet (vgl. Kallioniemi A, et al., Science 258:818, 1992, Kallioniemi O-P, et al., Genes Chromosom Cancer, 10:231, 1994 und Lichter P, et al. in Human Chromosomes, Hrsg. Verma R.S. und Babu A., New York, 1995, S. 191). Es zeigte sich, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in 30 bzw. 10 Colo320 (HSR) Zellen zwischen 89% und 94% aller Chromosomen-Überrepräsentationen erkannt wurden, während es ohne das TGH-Verfahren nur zwischen 38% und 44% waren. Ferner liegt der Anteil der falsch-positiven Befunde in der TGH-behandelten Gruppe deutlich niedriger als in der nicht-TGH-behandelten (7 gegenüber 19) (vgl. Fig. 2).

Ansprüche

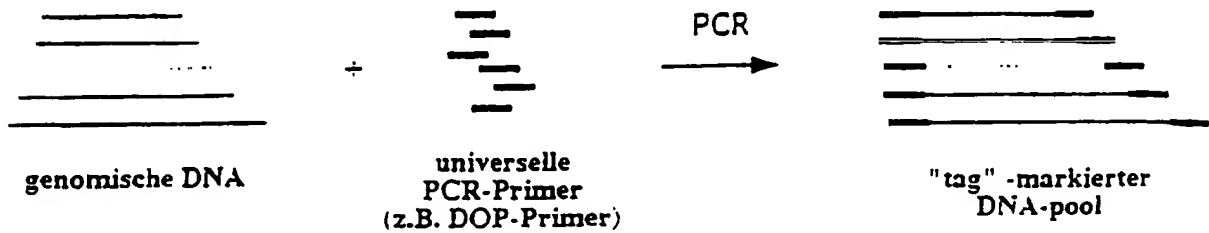
1. Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,
 - (b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),
 - (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und
 - (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen von Tumoren stammen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen aus dem Blut von schwangeren Personen stammen.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen solche einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen einen Interphase-Kern aufweisen.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die tag-Primer degenerative Primer sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung von (d) ein CGH-Verfahren umfaßt.
- 10 8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 7, umfassend die folgenden Komponenten:
- (a) amplifizierte DNA aus normalen Zellen, wobei die DNA von tag-Primern flankiert ist,
- 15 (b) tag-Primer, und übliche
- (c) Hilfsmittel, insbesondere solche, die sich zur Identifizierung numerischer Veränderungen in einer DNA eignen.
- 20

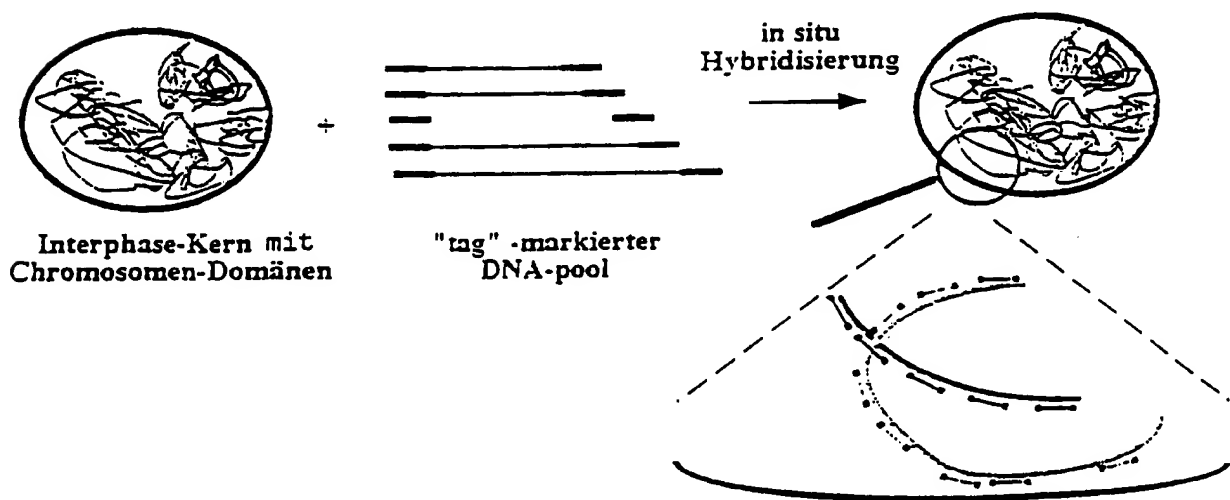
1/2

Schematische Darstellung der "Tagged Genome Hybridization"

- 1.) Herstellung eines repräsentativen "tag"-markierten DNA-Pools aus genomischer DNA normaler Zellen mittels eines universellen PCR-Verfahrens.



- 2.) In situ Hybridisierung von Interphasekernen mit "tag"-markiertem DNA-pool.



- 3.) Universelle PCR der isolierten Interphase-Kerne mit identischem Primer (siehe Schritt a)

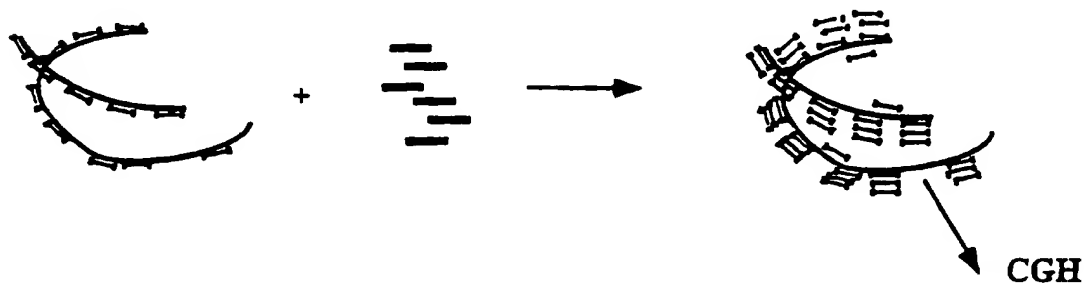
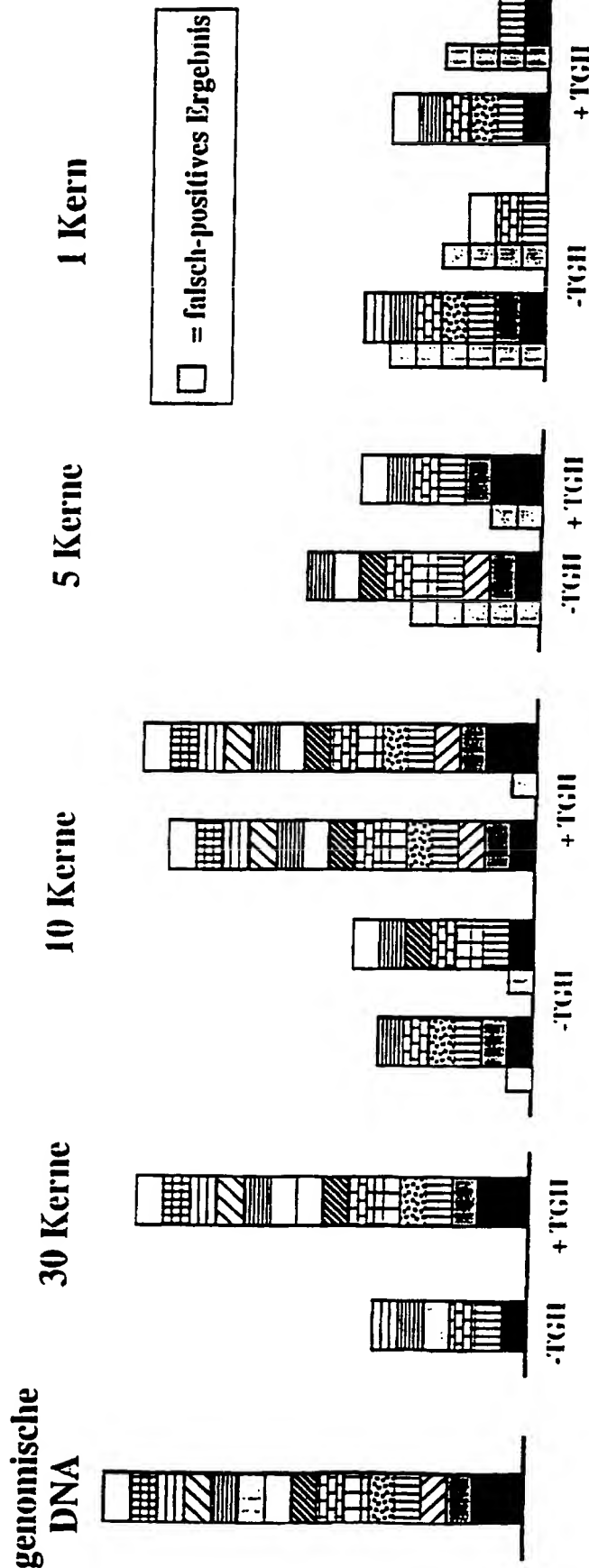


Fig. 1

Nachweisempfindlichkeit chromosomaler Überrepräsentationen in Colo 320 (HSR) - Zellen nach universeller PCR (DOP-PCR) und CGH



Überrepräsentationen chromosomaler Regionen der Zelllinie Colo 320 (HSR), nachgewiesen mittels CGH

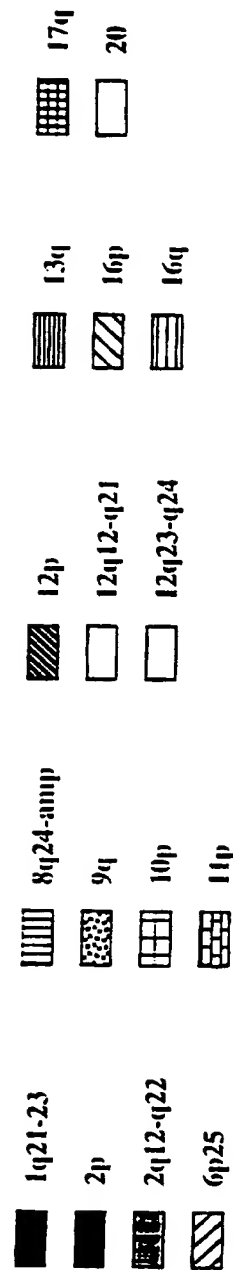


Fig. 2

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.6 C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 95/14 085 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE et al.) 26 May 1995 (26.05.95), claims 1-26,37	1,2,8
A	EP,A, 0 341 491 (MOLECULAR THERAPEUTICS) 15 November 1989 (15.11.89), claims	1
A	SCIENCE, Vol 258, Published on 1992, 30 October A. KALLIONIEMI et al. "Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors", pages 818-821, The whole document (cited in the application).	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 September 1997 (01.09.97)

Date of mailing of the international search report

19 September 1997 (19.09.97)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2412 PCT/hu/wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 97/00814	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23 April 1997 (23.04.1997)	(XXX/XXX/XX) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24 April 1996 (24.04.1996)
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt.

☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,

☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C 12 Q 1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

6

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C 12 Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO, A, 95/14 085 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE et al.) 26 Mai 1995 (26.05.95), Ansprüche 1-26,37.	1, 2, 8
A	EP, A, 0 341 491 (MOLECULAR THERAPEUTICS) 15 November 1989 (15.11.89), Ansprüche.	1
A	SCIENCE, Band 258, veröffentlicht 1992, 30 Oktober A. KALLIONIEMI et al. "Comparative Genomic Hybri- dization for Molecular Cyto- genetic Analysis of Solid Tumors",	1



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

01 September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.09.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

WOLF e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p>Seiten 818-821, ganzes Dokument (in der Beschreibung genannt). -----</p>	

ANHANG

zum internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEX

to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE

au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/DE 97/00814 SAE 161519

In diesem Anhang sind die Mitglieder
der Patentfamilien der im obenge-
nannten internationalen Recherchenbericht
angeführten Patentdokumente angegeben.
Diese Angaben dienen nur zur Unter-
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family
members relating to the patent documents
cited in the above-mentioned inter-
national search report. The Office is
in no way liable for these particulars
which are given merely for the purpose
of information.

La présente annexe indique les
membres de la famille de brevets
relatifs aux documents de brevets cités
dans le rapport de recherche inter-
national visée ci-dessus. Les renseigne-
ments fournis sont donnés à titre indica-
tif et n'engagent pas la responsabilité
de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
WO A3 9514085	29-06-95	AU A1 11830/95 EP A1 725819 WO A2 9514085	06-06-95 14-08-96 26-05-95
EP A2 341491	15-11-89	CA A1 1338704 DE C0 68916693 DE T2 68916693 EP A3 341491 EP B1 341491 JP A2 2020298 US A 5015570	12-11-96 18-08-94 03-11-94 31-07-91 13-07-94 23-01-90 14-05-91

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

C12Q 1/68

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/40185**(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

30. Oktober 1997 (30.10.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00814

(22) Internationales Anmeldedatum: 23. April 1997 (23.04.97)

(30) Prioritätsdaten:

196 16 381.1

24. April 1996 (24.04.96)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE];
Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOOS, Stefan [DE/DE];
Platanenweg 3, D-69221 Dossenheim (DE). LICHTER,
Peter [DE/DE]; Am Großen Wald 36, D-69251 Gaiberg
(DE).(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger
Strasse 246, D-81825 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE).

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.**Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.*

(54) Title: IDENTIFICATION OF NUMERICAL CHANGES IN CELL DNA

(54) Bezeichnung: NACHWEIS NUMERISCHER VERÄNDERUNGEN IN DER DNA VON ZELLEN

(57) Abstract

The invention pertains to a process for identifying numerical changes in cell DNA, comprising the following steps: (a) isolate DNA from normal cells and amplify the DNA by means of a polymerase chain reaction using tag primers; (b) in situ hybridize the cells under study with the amplified DNA; (c) amplify DNA from the in situ hybridized cells from (b) by means of a polymerase chain reaction using the tag primers from (a), and (d) identify numerical changes in the amplified DNA from (c) in a normal way. The invention also pertains to a kit suitable for carrying out the process.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte: (a) Isolierung von DNA aus normalen Zellen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern, (b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a), (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c) in üblicher Weise. Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2412	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00814	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/04/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 24/04/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 22/11/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.07.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Telefon (+49-89) 2399-8434 

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-12 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-4 eingegangen am 26/05/1998 mit Schreiben vom 22/05/1998

5-8 eingegangen am 25/06/1998 mit Schreiben vom 25/06/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

Punkt V:

Der Gegenstand der Ansprüche 1-8, i.e. ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in DNA und ein dazu verwendeter Kit, wird in den im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumenten weder offenbart, noch kann er aus diesen Dokumenten in naheliegender Weise abgeleitet werden. Die Ansprüche 1-8 entsprechen somit den Erfordernissen von Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Isolierung von DNA aus ~~normalen~~ Zellen, die keine bekannten numerischen Veränderungen in ihrer DNA aufweisen und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,

(b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),

(c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und

(d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c), ~~in üblicher Weise~~.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen von Tumoren stammen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen aus dem Blut von schwangeren Personen stammen.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen solche einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen einen Interphase-Kern aufweisen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die tag-Primer degenerative Primer sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung von (d) ein (CGH)-Verfahren umfaßt.

"Comparative Genomic Hybridisation"

8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 7, umfassend die folgenden Komponenten:

(a) amplifizierte DNA aus ~~normalen~~ Zellen, wobei die DNA von tag-Primern flankiert ist, die keine bekannten numerischen Veränderungen in ihrer DNA aufweisen,

(b) tag-Primer, und ggf. ~~und Gene~~

(c) Hilfsmittel, für die ~~insbesondere solche die sich zur~~ Identifizierung numerischer Veränderungen in einer DNA ~~eignen~~.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 06 JUL 1998

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2412	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00814	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/04/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 24/04/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 22/11/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.07.98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Telefon (+49-89) 2399-8434 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00814

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-12 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-4 eingegangen am 26/05/1998 mit Schreiben vom 22/05/1998

5-8 eingegangen am 25/06/1998 mit Schreiben vom 25/06/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE97/00814

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-8
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

Punkt V:

Der Gegenstand der Ansprüche 1-8, i.e. ein Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in DNA und ein dazu verwendeter Kit, wird in den im Internationalen Recherchenbericht zitierten Dokumenten weder offenbart, noch kann er aus diesen Dokumenten in naheliegender Weise abgeleitet werden. Die Ansprüche 1-8 entsprechen somit den Erfordernissen von Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis numerischer Veränderungen in der DNA von Zellen, umfassend die folgenden Schritte:

- 5 (a) Isolierung von DNA aus ~~normalen Zellen~~ ^{die keine bekannten numerischen Veränderungen in ihrer DNA aufweis} und Amplifikation der DNA mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung von tag-Primern,
- (b) In situ Hybridisierung von zu untersuchenden Zellen mit der amplifizierten DNA von (a),
- 10 (c) Amplifikation von DNA aus den in situ hybridisierten Zellen von (b) mittels eines PCR-Verfahrens unter Verwendung der tag-Primer von (a), und
- 15 (d) Identifizierung numerischer Veränderungen in der amplifizierten DNA von (c), ~~in üblicher Weise~~

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen von Tumoren stammen.

- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen aus dem Blut von schwangeren Personen stammen.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen solche einer kleinen Zellpopulation oder Einzelzellen sind.
- 25

14

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchenden Zellen einen Interphase-Kern aufweisen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die tag-Primer degenerative Primer sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung von (d) ein (CGH)-Verfahren umfaßt.

Comparative Genomic Hybridization

8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 7, umfassend die folgenden Komponenten:

(a) amplifizierte DNA aus ~~normalen~~ Zellen, wobei die DNA von tag-Primern flankiert ist, die keine bekannten numerischen Veränderungen in ihrer DNA aufweisen.

(b) tag-Primer, ~~und übrige~~ und ggf.

(c) Hilfsmittel, ~~insbesondere solche, die sich zur Identifizierung numerischer Veränderungen in einer DNA eignen.~~ für die

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

10 December 1997 (10.12.97)

International application No.

PCT/DE97/00814

Applicant's or agent's file reference

K 2412 PCT/hu/wd

International filing date (day/month/year)

23 April 1997 (23.04.97)

Priority date (day/month/year)

24 April 1996 (24.04.96)

Applicant

JOOS, Stefan et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 November 1997 (22.11.97)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Ingrid Hours

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

16 October 1998 (16.10.98)

International application No.

PCT/DE97/00814

International filing date (day/month/year)

23 April 1997 (23.04.97)

Applicant

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Christelle Croci

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference K 2412	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE97/00814	International filing date (day/month/year) 23 April 1997 (23.04.1997)	Priority date (day/month/year) 24 April 1996 (24.04.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 November 1997 (22.11.1997)	Date of completion of this report 02 July 1998 (02.07.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1994)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

International application No
PCT/DE97/00814

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been filed under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report.)

Receiving Office in response to an invitation
since they do not contain amendments.):

- ☐ the international application as originally filed,
- ☒ the description, pages 1-12, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-4, filed with the letter of 22 May 1998 (22.05.1998),
Nos. 5-8, filed with the letter of 25 June 1998 (25.06.1998)
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2, 2/2, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 97/00814

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1.	Statement		1 - 8	YES
	Novelty (N)	Claims		NO
		Claims	1 - 8	YES
	Inventive step (IS)	Claims		NO
		Claims	1 - 8	YES
	Industrial applicability (IA)	Claims		NO
		Claims		

2 Citations and explanations

The subject matter of claims 1 - 8, i.e., a process for detecting numerical changes in DNA and a kit used for this purpose, is neither disclosed in the documents cited in the international search report, nor is it derivable directly and unambiguously from those documents. Claims 1 - 8 therefore comply with the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C 12 Q 1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

6

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

C 12 Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO, A, 95/14 085 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE et al.) 26 Mai 1995 (26.05.95), Ansprüche 1-26, 37. --	1, 2, 8
A	EP, A, 0 341 491 (MOLECULAR THERAPEUTICS) 15 November 1989 (15.11.89), Ansprüche. --	1
A	SCIENCE, Band 258, veröffentlicht 1992, 30 Oktober A. KALLIONIEMI et al. "Comparative Genomic Hybri- dization for Molecular Cyto- genetic Analysis of Solid Tumors",	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche
01 September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.09.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 LV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

WOLF e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p data-bbox="422 136 812 273">Seiten 818-821, ganzes Dokument (in der Beschreibung genannt). -----</p>	

ANHANG

zum internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEX

to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE

au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/DE 97/00814 SAE 161519

In diesem Anhang sind die Mitglieder
der Patentfamilien der in obenge-
nannten internationalen Recherchenbericht
angeführten Patentedokumente angegeben.
Diese Angaben dienen nur zur Unter-
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family
members relating to the patent documents
cited in the above-mentioned inter-
national search report. The Office is
in no way liable for these particulars
which are given merely for the purpose
of information.

La présente annexe indique les
membres de la famille de brevets
relatifs aux documents de brevets cités
dans le rapport de recherche inter-
national visé ci-dessus. Les renseigne-
ments fournis sont donnés à titre indica-
tif et n'engagent pas la responsabilité
de l'Office.

In Recherchenbericht angeführtes Patentedokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
WO A3 9514085	29-06-95	AU A1 11830/95 EP A1 725819 WO A2 9514085	06-06-95 14-08-96 26-05-95
EP A2 341491	15-11-89	CA A1 1338704 DE CO 68916693 DE T2 68916693 EP A3 341491 EP B1 341491 JPD A2 2020298 US A 5015570	12-11-96 18-08-94 03-11-94 31-07-91 13-07-94 22-01-90 14-05-91

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2412 PCT/hu/wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 97/00814	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23 April 1997 (23.04.1997)	(Früheres) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 24 April 1996 (24.04.1996)
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
Abb. Nr. ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☒ keine der Abb.
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C 12 Q 1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK 6

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C 12 Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO, A, 95/14 085 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE et al.) 26 Mai 1995 (26.05.95), Ansprüche 1-26, 37. --	1, 2, 8
A	EP, A, 0 341 491 (MOLECULAR THERAPEUTICS) 15 November 1989 (15.11.89), Ansprüche. ---	1
A	SCIENCE, Band 258, veröffentlicht 1992, 30 Oktober A. KALLIONIEMI et al. "Comparative Genomic Hybri- dization for Molecular Cyto- genetic Analysis of Solid Tumors", ---	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche
01 September 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.09.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

WOLF e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	Seiten 818-821, ganzes Dokument (in der Beschreibung genannt). -----	